

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

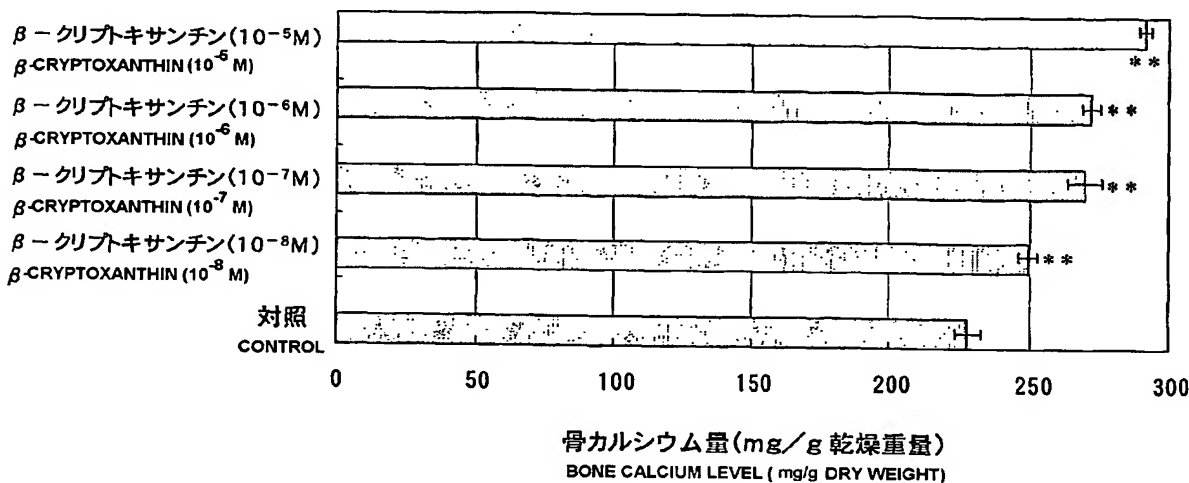
(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年5月6日 (06.05.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/037236 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A61K 31/045, 35/78, 45/00, A61P 19/08, 19/10, A23L 1/30
TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市 本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013561 (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山口 正義 (YAMAGUCHI, Masayoshi) [JP/JP]; 〒420-0913 静岡県 静岡市 瀬名川 1 丁目 1 5 番 1 5 号 Shizuoka (JP).
- (22) 国際出願日: 2003 年 10 月 23 日 (23.10.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2002-311930
2002 年 10 月 25 日 (25.10.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND
- (74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒107-0052 東京都港区 赤坂二丁目 8 番 5 号若林ビル 3 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): CA, JP, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

[続葉有]

(54) Title: OSTEOGENESIS PROMOTER CONTAINING β -CRYPTOXANTHIN AS THE ACTIVE INGREDIENT(54) 発明の名称: β -クリプトキサンチンを有効成分とする骨形成促進剤

(57) Abstract: It is intended to provide an osteogenesis promoter having a remarkable effect of positively promoting osteogenesis and thus preventing/treating bone diseases; a preventive/a remedy for bone diseases such as osteoporosis having both of an osteogenesis-promoting effect and a bone resorption-inhibiting effect; and a method of screening an active ingredient for preventing/treating bone diseases by using a compound having both of an osteogenesis-promoting effect and a bone resorption-inhibiting effect as a lead compound. It is confirmed that β -cryptoxanthin, which occurs in a large amount in peel and sarcocarp of satsuma orange, has an osteogenesis-promoting effect and a therapeutic effect on bone disease. Thus, β -cryptoxanthin or its composition is used as an osteogenesis promoter, a preventive/a remedy for bone diseases, a functional food or a food material for preventing/treating bone diseases and a feed composition.

(57) 要約: 積極的に骨形成を促進して骨疾患を予防・治療することができる顕著な効果を有する骨形成促進剤や、骨形成促進作用と骨吸収抑制作用の両作用を有する骨粗鬆症等の骨疾患の予防・治療薬や、骨形成促進作用と骨吸収抑制作用の両作用を有する化合物をリード化合物とする骨疾患に対する予防・治療のための有効成分のスクリーニング方法を提供するものである。温州みかんの表皮と果肉に多く存在する β -クリプトキサンチンに骨形成促進作用及び骨疾患治療作用があることを確認し、 β -クリプト

[続葉有]



添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

 β -クリプトキサンチンを有効成分とする骨形成促進剤

5 技術分野

- 本発明は、 β -クリプトキサンチンを有効成分とする骨形成促進剤や骨粗鬆症等の骨疾患の予防・治療薬、 β -クリプトキサンチンを添加した骨粗鬆症等の骨疾患の予防・治療用機能性食品又は食品素材や飼料用組成物、 β -クリプトキサンチンをリード化合物とする骨形成促進又は
- 10 骨疾患に対する予防・治療のための有効成分をスクリーニングする方法等に関する。

背景技術

- 骨代謝、骨形成不全により、骨中のカルシウム量の減少などが生じて、
- 15 種々の骨疾患が起こると考えられている。骨疾患の代表として骨折、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、腰背痛等がある。特にこれら骨疾患の中でも骨粗鬆症は、加齢による骨吸収と骨形成のバランスが崩れることで、相対的に骨吸収が優位となるために骨量の減少が起こり、骨の微細構造の変化により骨の強度が低下し、骨折が起こりやすくなる病態を示す。
- 20 特に女性の場合には、閉経や卵巣摘除などにより骨量の減少は急速に起こる。骨粗鬆症になると、骨折したり、激しい痛みなどを伴うだけでなく、特に老人の寝たきりの原因ともなるため、高齢化社会における生活の質の向上という観点からも、有効な治療法が求められている。骨粗鬆症は発症してから治療するのは困難であることから、予防に努めること
- 25 が重要であり、若年期から骨量を増やすことが不可欠で、日常的に骨形成に必要な栄養成分や、骨形成を促進する食品を積極的に摂取するよう

にしなければならないことが深く認識されるようになった。骨を強化する食品としては、現在、主にカルシウムやマグネシウム、ビタミンDが利用されている。また、カルシウムの腸管からの吸収を促進するカゼインホスホペプチドなども利用されている。

5 骨粗鬆症等の骨疾患の治療薬としては、活性型ビタミンD 3や女性ホルモン（エストロゲン）、カルシトニン、イブリフラボン類が臨床に用いられ、最近になって、ビタミンK 2に代表されるポリイソプレノイド誘導体の破骨細胞形成抑制作用に基づく抗骨粗鬆症剤（特開平7-215849号公報）も開発されている。また、カゼインホスホペプチド及び
10 ゲニステインを有効成分として含有する骨強化剤（特開2001-302539号公報）、サポニン、ダイジン、ダイゼイン、ゲニスチン及びゲニステインを主たる有効成分とする骨形成促進及び抗骨粗鬆症組成物（特開2000-191526号公報）、ワサビ抽出物を有効成分とし、抗骨粗鬆症作用を発揮する骨量増進組成物（特開平10-279492
15 号公報）、アセキサム酸亜鉛を有効成分とする骨疾患治療剤（特開平10-218767号公報）、イソフラボンを主たる有効成分とする骨形成促進及び骨塩量減少防止用組成物（特開平10-114653号公報）、ビタミンK 2と亜鉛を共に強化した抗骨粗鬆症組成物（特開平10-36256号公報）なども知られている。

20 他方、 β -クリプトキサンチン（ β -cryptoxanthine；分子量552）はエタノール溶解性のカロテノイドとして知られ、カンキツ類の中では温州みかんに圧倒的に多く含まれ、果実1個に1～2mg含まれている。この β -クリプトキサンチンは、栄養成分としてプロビタミンAの特性を備えているだけでなく、最近の抗癌性物質の研究においては、人参等
25 の緑黄色野菜に含有されているカロチノイドである β -カロチンよりも高い抗癌作用を有することが明らかになり関心を集めている（Biol.

Pharm. Bull. 18, 2, 227, 1995)。このように β -クリプトキサンチンは発癌抑制成分として重要であることから、 β -クリプトキサンチンを強化した柑橘系統や柑橘加工食品の開発に役立てるため、温州みかんに匹敵する β -クリプトキサンチン含量の高品質柑橘類作出や、 β -クリプトキサンチンを合成する遺伝子の単離(特開平11-155577号公報、特開平11-46770号公報)や、 β -クリプトキサンチンを柑橘類から大量に分離する技術の開発などが行われている。

また、 β -クリプトキサンチンの温州みかん等の柑橘類からの分離法はよく知られており(岡山大農学報 69, 17-25, 1987、東京医科大学紀要 18, 1-7, 1992、Journal of Food Biochemistry., 18, 273-283, 1995)、最近、みかん果汁を圧搾して得られた原料沈澱物等から β -クリプトキサンチンを含有する溶剤抽出分を得、これを加水分解した後、この加水分解物を一次展開溶媒と共に平均粒子径10~80 μ mのシリカ粉末が充填された第1カラムに線速度2cm/分以上の流速で導入して β -クリプトキサンチンを含むフラクションを分離し、脱溶媒した後、この分離物を二次展開溶媒と共に平均粒子径10~80 μ mのオクタデシルシランシリカが充填された第二カラムに線速度2cm/分以上の流速で導入して、 β -クリプトキサンチンを95重量%以上の量で含有するフラクションを分離する高純度 β -クリプトキサンチンの製造方法(特開2000-136181号公報)や、柑橘類の果実を搾汁、ろ過又は篩別後、遠心分離して得られる沈澱物に酵素剤を添加して凍結し、解凍した後、脱水することを特徴とするカロチノイド高含有パルプの製造方法、上記カロチノイド高含有パルプを加水して脱水する操作を繰り返した後、乾燥、粉碎するカロチノイド、 β -クリプトキサンチン等の含有率が増強されたカロチノイド高含有パルプ及びその粉末の製造方法(特開2000-23637号公報)が提案されている。

さらに、リード化合物の活性の可能性のある類似体を迅速に検索するための方法として、ラジカルを一時的にかさ高い空間保持基に結合し、ラジカルを3Dモデルをコンビナトリアルゴーストデータベースに登録し、ゴーストデータベース内のアクセス可能な任意の分子構造について、

5 ファーマコホア型の物理的性質の特色を示す任意の原子を検出し；各分子構造中に検出されたファーマコホアの対について、この分子の全立体構造に関係する原子の間のすべての距離を計算して、距離分布密度を作成し；ファーマコホアの対のすべての距離分布密度を含む立体構造フィンガープリントベクターを作成し；ファーマコホア特色の相対的重要性

10 を説明する、各分子フィンガープリントのための評点機能を定義し；リード化合物のフィンガープリントを作成し、リード化合物が最大になる上記評点機能により、これらのフィンガープリントを可能性あるライブラリーの各フィンガープリントと比較し、そして評点機能により特定の閾値未満の評点値が得られる、可能性あるライブラリーの分子を検索す

15 ることにより、3D多重立体構造フィンガープリントの大きなデータベースから、化学的に可能なコンビナトリアル生成物を作成及びスクリーニングする方法が知られている（特表2001-521943号公報）。

骨粗鬆症に代表される骨疾患において我が国で現在認可されている8

20 種の治療剤は総て骨吸収抑制剤（骨が溶けるのを抑制する）であり、唯一メパロン酸合成阻害剤であるスタチンに骨形成促進作用があると報じられたが、遺伝子レベルの知見であり、実際には、骨形成促進効果は弱いものであった。本発明の課題は、積極的に骨形成を促進して骨疾患を

25 予防・治療することができる顕著な効果を有する骨形成促進剤や、骨形成促進作用と骨吸収抑制作用の両作用を有する骨粗鬆症等の骨疾患の予防・治療薬や、骨形成促進作用と骨吸収抑制作用の両作用を有する化合

物をリード化合物とする骨疾患に対する予防・治療のための有効成分のスクリーニング方法等を提供することにある。

本発明者らは、温州みかんの表皮と果肉に多く存在する β -クリプトキサンチンに骨形成促進作用及び骨疾患の予防・治療作用があることを見い出した。すなわち、 β -クリプトキサンチンを含む培養液中で大腿骨の骨幹部と骨幹端部組織を培養し、その骨組織中のカルシウム量、骨石灰化促進酵素の発現量、骨組織中の細胞数指標となるDNA量を測定し、いずれにおいても有意な上昇を確認し、 β -クリプトキサンチンが、大腿骨組織の海綿骨（骨幹端部組織）及び皮質骨（骨幹部組織）におけるタンパク質合成を増進し、骨形成を増大することを見い出した。また、骨塩溶解（骨吸収）作用を有し、老化による骨粗鬆症病態発症の生理的役割を果たしている副甲状腺ホルモン（PTH）と β -クリプトキサンチンの共存下で骨組織を培養し、骨幹部組織及び骨幹端部組織のカルシウム量の減少を有意に抑制しうることを確認した。さらに、 β -クリプトキサンチンをラットに経口投与したところ、骨幹部と骨幹端部組織中のカルシウム量、骨石灰化促進酵素の発現量、骨組織中の細胞数指標となるDNA量のいずれにおいても有意な上昇を示し、 β -クリプトキサンチンを経口投与することにより、骨量増進効果がもたらされることを確認した。これらのことから、 β -クリプトキサンチンが、骨形成を増進すると共に、骨吸収を抑制することにより、骨塩量を保持・増進する効果を発揮し、抗骨粗鬆症因子として機能することを明らかにした。そして、このような組織培養系で確認された効果は、経験的に経口実験でもほぼ100%有効性が確認されている。本発明はこれら知見に基づいて完成するに至ったものである。

発明の開示

- すなわち本発明は、 β -クリプトキサンチンを有効成分とすることを特徴とする骨形成促進剤（請求項1）や、 β -クリプトキサンチン含有組成物を有効成分とすることを特徴とする骨形成促進剤（請求項2）や、
- 5 β -クリプトキサンチン含有組成物が、温州みかんの処理物であることを特徴とする請求項2記載の骨形成促進剤（請求項3）や、 β -クリプトキサンチンを有効成分とすることを特徴とする骨疾患の予防・治療薬（請求項4）や、 β -クリプトキサンチン含有組成物を有効成分とすることを特徴とする骨疾患の予防・治療薬（請求項5）や、 β -クリプト
- 10 キサンチン含有組成物が、温州みかんの処理物であることを特徴とする請求項5記載の骨疾患の予防・治療薬（請求項6）や、骨疾患が骨粗鬆症であることを特徴とする請求項4～6のいずれか記載の骨疾患の予防・治療薬（請求項7）や、 β -クリプトキサンチンを添加したことを特徴とする骨疾患の予防・治療用機能性食品又は食品素材（請求項8）
- 15 や、 β -クリプトキサンチン含有組成物を添加したことを特徴とする骨疾患の予防・治療用機能性食品又は食品素材（請求項9）や、 β -クリプトキサンチン含有組成物が、温州みかんの処理物であることを特徴とする請求項9記載の骨疾患の予防・治療用機能性食品又は食品素材（請求項10）や、骨疾患が骨粗鬆症であることを特徴とする請求項8～1
- 20 0のいずれか記載の骨疾患の予防・治療用機能性食品又は食品素材（請求項11）に関する。

- また本発明は、 β -クリプトキサンチンを配合したことを特徴とする飼料用組成物（請求項12）や、 β -クリプトキサンチン含有組成物を配合したことを特徴とする飼料用組成物（請求項13）や、 β -クリプト
- 25 トキサンチン含有組成物が、温州みかんの処理物であることを特徴とする請求項13記載の飼料用組成物（請求項14）や、 β -クリプトキサ

- ンチンをリード化合物とすることを特徴とする骨形成促進又は骨疾患に対する予防・治療のための有効成分をスクリーニングする方法（請求項 15）や、骨疾患が骨粗鬆症であることを特徴とする請求項 15 記載の骨形成促進又は骨疾患に対する予防・治療のための有効成分をスクリー
- 5 ニングする方法（請求項 16）や、請求項 15 又は 16 記載のスクリーニングする方法により得られることを特徴とする β -クリプトキサンチンをリード化合物とした骨形成促進剤又は骨疾患の予防・治療剤（請求項 17）や、骨疾患が骨粗鬆症であることを特徴とする請求項 17 記載の β -クリプトキサンチンをリード化合物とした骨形成促進剤又は骨疾
- 10 患の予防・治療剤（請求項 18）に関する。

図面の簡単な説明

- 第 1 図は、本発明の β -クリプトキサンチンの骨幹部組織における骨カルシウム量の測定結果を示す図である。
- 15 第 2 図は、本発明の β -クリプトキサンチンの骨幹部組織における骨アルカリ性ホスファターゼ活性の測定結果を示す図である。
- 第 3 図は、本発明の β -クリプトキサンチンの骨幹部組織における骨 DNA 量の測定結果を示す図である。
- 第 4 図は、本発明の β -クリプトキサンチンの骨幹端部組織における
- 20 骨カルシウム量の測定結果を示す図である。
- 第 5 図は、本発明の β -クリプトキサンチンの骨幹端部組織における骨アルカリ性ホスファターゼ活性の測定結果を示す図である。
- 第 6 図は、本発明の β -クリプトキサンチンの骨幹端部組織における骨 DNA 量の測定結果を示す図である。
- 25 第 7 図は、本発明の β -クリプトキサンチンとタンパク合成阻害剤との共存下における骨幹部組織での骨カルシウム量の測定結果を示す図で

ある。

第 8 図は、本発明の β -クリプトキサンチンとタンパク合成阻害剤との共存下における骨幹部組織での骨アルカリ性ホスファターゼ活性の測定結果を示す図である。

- 5 第 9 図は、本発明の β -クリプトキサンチンとタンパク合成阻害剤との共存下における骨幹部組織での骨 DNA 量の測定結果を示す図である。

第 10 図は、本発明の β -クリプトキサンチンとタンパク合成阻害剤との共存下における骨幹端部組織での骨カルシウム量の測定結果を示す図である。

- 10 第 11 図は、本発明の β -クリプトキサンチンとタンパク合成阻害剤との共存下における骨幹端部組織での骨アルカリ性ホスファターゼ活性の測定結果を示す図である。

第 12 図は、本発明の β -クリプトキサンチンとタンパク合成阻害剤との共存下における骨幹端部組織での骨 DNA 量の測定結果を示す図で

- 15 ある。

第 13 図は、本発明の β -クリプトキサンチンと β -カロテンとの共存下、及び β -クリプトキサンチンとキサンチンの共存下における骨幹部組織での骨カルシウム量の測定結果を示す図である。

- 20 第 14 図は、本発明の β -クリプトキサンチンと β -カロテンとの共存下、及び β -クリプトキサンチンとキサンチンとの共存下における骨幹端部組織での骨カルシウム量の測定結果を示す図である。

第 15 図は、本発明の β -クリプトキサンチンと副甲状腺ホルモンとの共存下における骨幹部組織での骨カルシウム量の測定結果を示す図である。

- 25 第 16 図は、本発明の β -クリプトキサンチンと副甲状腺ホルモンとの共存下における骨幹端部組織での骨カルシウム量の測定結果を示す図

である。

第 17 図は、本発明の β -クリプトキサンチンとプロスタグランジン E_2 との共存下における骨幹部組織での骨カルシウム量の測定結果を示す図である。

5 第 18 図は、本発明の β -クリプトキサンチンとプロスタグランジン E_2 との共存下における骨幹端部組織での骨カルシウム量の測定結果を示す図である。

第 19 図は、本発明の β -クリプトキサンチンをラットに経口投与したときの骨幹部組織における骨カルシウム量の測定結果を示す図である。

10 第 20 図は、本発明の β -クリプトキサンチンをラットに経口投与したときの骨幹部組織における骨アルカリ性ホスファターゼ活性の測定結果を示す図である。

第 21 図は、本発明の β -クリプトキサンチンをラットに経口投与したときの骨幹部組織における骨 DNA 量の測定結果を示す図である。

15 第 22 図は、本発明の β -クリプトキサンチンをラットに経口投与したときの骨幹端部組織における骨カルシウム量の測定結果を示す図である。

第 23 図は、本発明の β -クリプトキサンチンをラットに経口投与したときの骨幹端部組織における骨アルカリ性ホスファターゼ活性の測定結果を示す図である。

20 第 24 図は、本発明の β -クリプトキサンチンをラットに経口投与したときの骨幹端部組織における骨 DNA 量の測定結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

25 本発明の骨形成促進剤としては、 β -クリプトキサンチンや β -クリプトキサンチン含有組成物を有効成分とするものであれば特に制限され

るものではなく、また、本発明の骨疾患の予防・治療薬としては、 β -クリプトキサンチンや β -クリプトキサンチン含有組成物を有効成分とするものであれば特に制限されるものではなく、また、本発明の骨疾患の予防・治療用機能性食品又は食品素材としては、 β -クリプトキサンチンや β -クリプトキサンチン含有組成物を添加した、骨疾患の予防・治療に用いられる、骨疾患の予防・治療機能を有する食品や食品素材であれば特に制限されるものではなく、さらに、本発明の飼料用組成物としては、 β -クリプトキサンチンや β -クリプトキサンチン含有組成物を配合したものであればどのようなものでもよく、上記骨疾患としては、骨折、骨軟化症、骨減少症、骨粗鬆症、腰背痛等を挙げることができ、中でも、閉経後骨粗鬆症、エストロゲン欠乏性骨粗鬆症、老人性骨粗鬆症、ステロイド誘発骨粗鬆症等の骨粗鬆症や骨軟化症などの代謝性骨疾患を好適に例示することができる。

β -クリプトキサンチンや β -クリプトキサンチン含有組成物の製法としては、柑橘類から抽出・生成する方法や、 β -クリプトキサンチン産生酵素をコードする遺伝子を利用する方法など公知の方法を含め特に制限されないが、その給源として、1個当たり1～2mg含まれ、オレンジ類、グレープフルーツ、レモンなど他の柑橘類の60倍以上の β -クリプトキサンチンを含有する温州みかんを用いることが好ましく、温州みかんの中でも、果皮（フラベド）100g当たり約8mg、果汁100g当たり約1mgの β -クリプトキサンチンを含有する杉山温州等の高 β -クリプトキサンチン含有品種の温州みかんや、温州みかんととの交配により作出された高 β -クリプトキサンチン含有品種を用いることが好ましい。ここで、 β -クリプトキサンチン含有組成物とは、人為的に β -クリプトキサンチン含量が高められた β -クリプトキサンチンの混在物をいう。また、温州みかんを処理して β -クリプトキサンチン含

有組成物を得る方法としては特に制限されず、例えば、前述の特許文献 10 や特許文献 11 の他、非特許文献 2 ～ 4 記載の処理方法を挙げることができる。

5 β -クリプトキサンチンや β -クリプトキサンチン含有組成物を、骨疾患の予防・治療薬等の医薬品として用いる場合は、薬学的に許容される通常の担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、pH 緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配合成分を添加することができる。また、これらに加えて、上述した公知の骨形成促進作用及び／又は骨吸収抑制作用を有する物質や、カルシウム、マグネシウム、リン等のミネラルを併用することができる。これら予防若しくは治療剤は、経口的又は非経口的に投与することができる。すなわち通常用いられる投与形態、例えば粉末、顆粒、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の剤型で経口的に投与することができ、あるいは、例えば溶液、乳剤、懸濁液等の剤型にしたものを注射の型で非経口投与することができる他、スプレー剤の型で鼻孔内投与することもできるが、経口的に投与することが好ましい。投与量は、予防か治療かの投与目的、骨疾患の種類や重篤度、患者の年齢等に応じて適宜選定することができる。

20 β -クリプトキサンチンや β -クリプトキサンチン含有組成物を添加した、骨疾患の予防・治療に用いられる、骨疾患の予防・治療機能を有する食品や食品素材の種類としては特に制限されず、例えば、ヨーグルト、ドリンクヨーグルト、ジュース、牛乳、豆乳、酒類、コーヒー、紅茶、煎茶、ウーロン茶、スポーツ飲料等の各種飲料や、プリン、クッキー、パン、ケーキ、ゼリー、煎餅などの焼き菓子、羊羹などの和菓子、冷菓、チューインガム等のパン・菓子類や、うどん、そば等の麺類や、25 かまぼこ、ハム、魚肉ソーセージ等の魚肉練り製品や、みそ、しょう油、ドレッシング、マヨネーズ、甘味料等の調味料や、チーズ、バター等の

乳製品や、豆腐、こんにゃく、その他佃煮、餃子、コロッケ、サラダ等の各種総菜を挙げることができる。これら食品や食品素材には、上述した公知の骨形成促進作用及び／又は骨吸収抑制作用を有する物質や、カルシウム、マグネシウム、リン等のミネラルを併用してもよい。

- 5 β -クリプトキサンチンや β -クリプトキサンチン含有組成物を配合した飼料用組成物は、ブタ、ウシ、ニワトリ等の家畜・家禽や、イヌ、ネコ等のペット、養殖魚介類の飼育等に有利に用いることができ、かかる飼料用組成物には、上述したイプリフラボン類等の公知の骨形成促進作用及び／又は骨吸収抑制作用を有する物質や、カルシウム、マグネシウム、リン、鉄、亜鉛、マンガン、銅等のミネラルを併用することができる。

- 15 本発明の骨粗鬆症等の骨疾患に対する予防・治療のための有効成分をスクリーニングする方法としては、 β -クリプトキサンチンをリード化合物とするスクリーニング方法であれば特に制限されるものではなく、かかる β -クリプトキサンチンをリード化合物とするスクリーニング方法により、さらに効力の高い骨形成促進剤や骨疾患の予防・治療剤の開発が可能になる。 β -クリプトキサンチンをリード化合物とした骨形成促進剤や骨疾患の予防・治療剤のスクリーニングを行うには、例えば上述の特許文献12に記載された方法等のコンビナトリアルケミストリーの手法を用いれば効率よく行うことができる。また、コンビナトリアルケミストリーの手法を用いなくとも、古典的な構造活性相関の手法を用いて β -クリプトキサンチンをリード化合物とする骨形成促進剤や骨疾患の予防・治療剤のスクリーニングを行うこともできる。そして、 β -クリプトキサンチンをリード化合物とするスクリーニング方法により得られる骨形成促進剤や骨疾患の予防・治療剤も本発明に含まれる。
- 20
- 25

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

実施例 1 [方法]

(ラット骨組織片の培養)

- 5 ラット(ウイスター系雄性; 4~5 週齢)(日本 S L C (株)から購入、固形飼料オリエンタル酵母(MF))をエーテル麻酔下到大腿骨を無菌的に摘出し、大腿骨は 0. 25 M の蔗糖液で洗浄後、骨幹部(皮質骨)と骨幹端部(海綿骨)に分け、 β -クリプトキサンチン等を含有する培養液(ダルベッコ変法 5 % グルコース含有培養液、無血清培養液)中で、
- 10 上記骨組織片を 37 °C の条件下で 48 時間、5 % CO_2 - 95 % a i r のインキュベーター中で培養した。また、 β -クリプトキサンチンはエクストラシンテース社製「 β -クリプトキサンチン」を、シクロヘキシイミドはシグマ社製「シクロヘキシイミド」を、 β -カロテンはシグマ社製「 β -カロテン」を、キサンチンはシグマ社製「キサンチン」を、
- 15 副甲状腺ホルモンはシグマ社製「副甲状腺ホルモン」を、プロスタグランジン E_2 はシグマ社製「プロスタグランジン E_2 」を用いた。なお、 β -クリプトキサンチン等を添加することなく、培養液のみで培養した場合を対照とした。

(骨カルシウムの測定)

- 20 骨組織中のカルシウム量を測定した。インキュベーター中で培養した後、組織片を 0. 25 M 蔗糖溶液で洗浄、乾燥後、骨重量を測定した。その後、組織片に濃硝酸を加えて 120 °C で 12 時間灰化し、原子吸光分光光度計(パーキンエルマー社製「パーキンエルマー 303」)を用いて骨カルシウム量を定量した。

- 25 (アルカリ性ホスファターゼ活性の測定)

骨の石灰化の促進に関する最も重要な酵素であるアルカリ性ホスファ

ターゼの発現量を調べた。インキュベーター中で培養した後、組織片を 0.25 M の蔗糖液で洗浄し、6.5 mM のバルビタール緩衝液 (pH 7.4) 3 ml 中で破碎し、超音波処理した。この液を遠心分離して上清を酵素液として Walter 及び Schutt の方法 (in Method of Enzymatic Analysis, Vol1-2, p856, Academic Press, New York, 1965) に従って測定した。すなわち、p-ニトロフェニール燐酸を基質として、ジエタノールアミン緩衝液 (pH 9.8) 2 ml に酵素液 0.05 ml を添加し、37℃で30分間インキュベーションし、0.05 N の NaOH を 10 ml 添加した後、分光光度計を用いて吸光度 (405 nm) を測定し、骨に対する治療剤及び骨に対する作用の知られている化合物の骨アルカリ性ホスファターゼ活性を調べた。

(DNA量の定量)

骨組織中の細胞数の指標として、DNA量を定量した。インキュベーター中で培養した後、組織片を 0.25 M の蔗糖溶液で洗浄し、湿重量を測定した。その後、0.1 N の NaOH 4 ml 中で粉碎して、4℃で24時間浸透させた。この液を遠心分離し、上清を試料として Ceriotti らの方法 (J. Biol. Chem., 241: 34-77, 1951) に従って定量した。即ち、試料 2 ml に濃塩酸 1 ml 及び 0.04 % のインドール溶液 1 ml を添加し沸騰水中で 100℃に加熱後、急冷して、クロロホルム 4 ml で抽出し、クロロホルム層を採取して、分光光度計 (490 nm) を用いて骨中の DNA 量を測定した。

(ラットへのβ-クリプトキサンチンの経口投与)

ラット (ウイスター系雄性; 4~5週齢) に、β-クリプトキサンチンをコーン油に溶解した3種類の濃度のβ-クリプトキサンチン溶解液 (10, 25 及び 50 µg/ml コーン油) を、骨ゾンデを用いてラット体重 100 g 当たり 1 日 1 回、7 日間経口投与した。最終投与の 24

時間目に屠殺し、大腿骨を摘出し、筋肉等を取り除き、骨幹部(diaphysis)と骨幹端部(metaphysis)に分けて、骨成分を測定した。

実施例 2 [結果]

(β -クリプトキサンチンの骨形成増進作用の発現)

- 5 β -クリプトキサンチンの骨成分増加効果について調べた。 β -クリプトキサンチン ($10^{-8} \sim 10^{-5} \text{ M}$) を含有する上記培養液中で、大腿骨の骨幹部と骨幹端組織を 48 時間培養した。骨組織中のカルシウム量、アルカリ性ホスファターゼ活性 (骨石灰化促進酵素) 及びデオキシリボ核酸 (DNA; 骨組織中細胞数の指標) 量を実施例 1 記載の方法で
- 10 測定した。結果を表 1 及び第 1 図～第 6 図に示す。なお、それぞれの試験群は 6～8 回ずつ測定し、平均値及び標準誤差で示した。また、有意差検定には Student's t-test を用いて求め、対照と比較して P 値が 0.01 以下 (**) 又は 0.05 以下 (*) であれば統計学的に有意差ありとした。その結果、クリプトキサンチン ($10^{-8} \sim 10^{-5} \text{ M}$) は、
- 15 骨幹部及び骨幹端部組織のカルシウム量の有意な増加をひき起こした。また、クリプトキサンチン ($10^{-8} \sim 10^{-5} \text{ M}$) は、骨幹部アルカリ性ホスファターゼ活性を有意に増加させ、クリプトキサンチン ($10^{-7} \sim 10^{-5} \text{ M}$) は、骨幹端部の本酵素活性の上昇をひき起こした。さらに、骨幹部組織及び骨幹端部組織 DNA 量は、クリプトキサンチン (10^{-7}
- 20 $\sim 10^{-5} \text{ M}$) の存在下で有意に増加した。

(表 1)

骨幹部組織					
	対照	β -クリプトキサンチン			
		10^{-8}M	10^{-7}M	10^{-6}M	10^{-5}M
骨カルシウム量 (mg/g乾燥重量)	228.2±4.76	249.6±3.33**	269.9±6.26**	272.2±3.15**	291.7±2.29**
骨アルカリ性ホスファターゼ活性 (nmol/min/mg蛋白質)	554.8±11.4	568.5±9.5	604.2±9.6*	684.0±17.7**	644.6±15.2**
骨DNA量 (mg/g骨湿重量)	1.551±0.056	1.741±0.099	1.788±0.049*	1.746±0.016*	1.802±0.063**

骨幹端部組織					
	対照	β -クリプトキサンチン			
		10^{-8}M	10^{-7}M	10^{-6}M	10^{-5}M
骨カルシウム量 (mg/g乾燥重量)	174.7±4.47	204.7±6.40**	223.6±9.27**	216.8±2.84**	213.5±5.59**
骨アルカリ性ホスファターゼ活性 (nmol/min/mg蛋白質)	908.3±5.1	918.4±4.3	945.2±5.4**	1150.9±26.8**	1229.5±40.9**
骨DNA量 (mg/g骨湿重量)	3.061±0.054	3.276±0.207	4.170±0.057**	5.359±0.207**	5.584±0.530**

5 (タンパク質合成阻害剤の影響)

β -クリプトキサンチンの骨成分増加効果の発現に及ぼすタンパク質合成阻害剤の影響について調べた。タンパク質合成阻害剤としては、真核細胞の60Sリボゾームに作用し、ペプチド鎖延長における転移反応を阻害するシクロヘキシイミドを用いた。 β -クリプトキサンチン (10^{-6}M) の存在下、シクロヘキシイミド (10^{-6}M) の存在下、 β -クリプトキサンチン (10^{-6}M) とシクロヘキシイミド (10^{-6}M) の共存下における、骨組織中のカルシウム量、アルカリ性ホスファターゼ活性及びDNA量を測定した。結果を表2及び第7図～第12図に示

す。それぞれの試験群は6回ずつ測定し、平均値及び標準誤差で示した。
 また、有意差検定には Student' s t-test を用いて求め、対照と比較してP値が0.01以下(*)であれば統計学的に有意差ありとした。 β -
 5 クリプトキサンチン(10^{-6} M)の存在下で増加した骨幹部及び骨幹
 端部組織におけるカルシウム量、骨アルカリ性ホスファターゼ活性及び
 骨DNA量はシクロヘキシミド(10^{-6} M)の存在下で有意に低下した。これらの結果は、 β -クリプトキサンチンが、大腿骨組織の海綿骨
 (骨幹端部組織)及び皮質骨(骨幹部組織)において、そのタンパク質
 合成を増進することにより、骨形成を増大していることを明らかにして
 10 いる。

(表2)

骨幹部組織				
	対照	β -クリプトキサンチン 10^{-6} M	シクロヘキシミド 10^{-6} M	シクロヘキシミド+クリプトキサンチン 10^{-6} M
骨カルシウム量 (mg/g乾燥重量)	225.0 \pm 5.01	275.1 \pm 4.50*	204.0 \pm 15.59	192.6 \pm 9.00
骨アルカリ性ホスファターゼ活性 (nmol/min/mg蛋白質)	560.1 \pm 8.9	691.5 \pm 11.2*	534.5 \pm 64.2	530.0 \pm 10.0
骨DNA量 (mg/g骨湿重量)	1.403 \pm 0.065	1.800 \pm 0.025*	1.299 \pm 0.127	1.402 \pm 0.133

骨幹端部組織				
	対照	β -クリプトキサンチン 10^{-6} M	シクロヘキシミド 10^{-6} M	シクロヘキシミド+クリプトキサンチン 10^{-6} M
骨カルシウム量 (mg/g乾燥重量)	178.0 \pm 5.11	220.0 \pm 3.25*	156.4 \pm 2.81	168.0 \pm 10.67
骨アルカリ性ホスファターゼ活性 (nmol/min/mg蛋白質)	898.1 \pm 11.3	1168.2 \pm 30.1*	948.8 \pm 21.1	957.0 \pm 37.0
骨DNA量 (mg/g骨湿重量)	3.020 \pm 0.049	5.401 \pm 0.188*	3.001 \pm 0.454	3.499 \pm 0.259

(比較例)

β -クリプトキサンチンに代えて、 β -カロテン (β -carotene) とキサンチン (xantine; 2,6-dihydroxypurine) の骨カルシウム量に及ぼす効果について調べた。 β -カロテンの 10^{-7} M 及びキサンチンの 10^{-6} M をそれぞれ培養液中に存在させ、実施例 1 記載の方法で、骨幹部あるいは骨幹端部組織を 48 時間培養した後、骨組織中のカルシウム量を測定した。結果を表 3 及び第 13 図、第 14 図に示す。表 3 中の各値は 6 ~ 8 匹のラットの平均値 \pm 標準誤差を示す。表 3 から明らかなように、 β -カロテンやキサンチンでは、骨組織中カルシウム量の有意な増加効果は発現することがなかった。

(表 3)

骨幹部組織					
	対照	β -カロテン		キサンチン	
		10^{-7} M	10^{-6} M	10^{-7} M	10^{-6} M
骨カルシウム量 (mg/g 乾燥重量)	227.9 \pm 2.60	232.2 \pm 6.66	215.6 \pm 2.78	228.6 \pm 7.08	240.2 \pm 8.46

骨幹端部組織					
	対照	β -カロテン		キサンチン	
		10^{-7} M	10^{-6} M	10^{-7} M	10^{-6} M
骨カルシウム量 (mg/g 乾燥重量)	181.1 \pm 5.57	195.4 \pm 10.10	189.4 \pm 8.06	189.8 \pm 3.30	188.2 \pm 3.34

(β -クリプトキサンチンの骨吸収抑制作用の発現)

β -クリプトキサンチンの骨塩溶解抑制効果について調べた。副甲状腺

腺ホルモン (parathyroid hormone; PTH) は、副甲状腺から分泌され、骨塩溶解 (骨吸収) 作用を発揮するペプチドホルモンで、老化に伴った骨粗鬆症の発現に病態生理的役割を果たしている。同様に、プロスタグランジン E_2 も生理的な骨塩溶解をひき起こすことが知られている。そこで、大腿骨の骨幹部及び骨幹端部組織を $10^{-7} M$ の PTH の存在下、又は $10^{-5} M$ のプロスタグランジン E_2 の存在下で 48 時間培養した後、骨組織中のカルシウム量を測定した。また、これらと β -クリプトキサンチン ($10^{-8} \sim 10^{-6} M$) の共存下で、同様に培養した後、骨組織中のカルシウム量を測定した。結果を表 4 及び第 15 図～第 18 図に示す。それぞれの試験群は 6～8 回ずつ測定し、平均値及び標準誤差で示した。また、有意差検定には Student's t-test を用いて求め、対照と比較して P 値が 0.01 以下 (*), 又は PTH やプロスタグランジン E_2 単独と比較して P 値が 0.01 以下 (#) であれば統計学的に有意差ありとした。PTH 存在下で骨組織を培養すると、骨幹部及び骨幹端部組織のカルシウム量が有意に減少した。この減少は、 β -クリプトキサンチン ($10^{-8} \sim 10^{-6} M$) の存在下で有意に抑制された。同様に、生理的な骨塩溶解をひき起こすプロスタグランジン E_2 ($10^{-5} M$) においても、骨組織中カルシウム量の有意な減少がひき起こされたが、この減少は β -クリプトキサンチン ($10^{-8} \sim 10^{-6} M$) の存在下で完全に抑制された。

以上の結果より、 β -クリプトキサンチンは、骨形成を増進・促進するとともに、骨吸収を抑制することにより、骨塩量を保持・増進する効果を発揮し、抗骨粗鬆症因子として機能することが確かめられた。

(表 4)

骨幹部組織					
	対照	副甲状腺ホルモン	副甲状腺ホルモン+ β -クリプトキサンチン		
		10^{-7} M	10^{-8} M	10^{-7} M	10^{-6} M
骨カルシウム量 (mg/g乾燥重量)	228.0 \pm 2.56	180.0 \pm 3.23*	226.1 \pm 6.43 [#]	226.3 \pm 5.89 [#]	274.2 \pm 5.02* [#]
	対照	プロスタグランジンE2	プロスタグランジンE2+ β -クリプトキサンチン		
		10^{-5} M	10^{-8} M	10^{-7} M	10^{-6} M
骨カルシウム量 (mg/g乾燥重量)	228.0 \pm 2.56	182.8 \pm 4.06*	226.3 \pm 3.33 [#]	227.8 \pm 5.52 [#]	243.1 \pm 11.04 [#]

骨幹端部組織					
	対照	副甲状腺ホルモン	副甲状腺ホルモン+ β -クリプトキサンチン		
		10^{-7} M	10^{-8} M	10^{-7} M	10^{-6} M
骨カルシウム量 (mg/g乾燥重量)	180.6 \pm 3.61	167.0 \pm 0.96*	200.6 \pm 8.66 [#]	193.6 \pm 8.02 [#]	206.0 \pm 9.81 [#]
	対照	プロスタグランジンE2	プロスタグランジンE2+ β -クリプトキサンチン		
		10^{-5} M	10^{-8} M	10^{-7} M	10^{-6} M
骨カルシウム量 (mg/g乾燥重量)	180.6 \pm 3.61	163.5 \pm 1.47*	196.6 \pm 6.87 [#]	206.4 \pm 9.13 [#]	206.8 \pm 11.10 [#]

5 (ラットに β -クリプトキサンチン経口投与による骨成分の増加)

ラットに β -クリプトキサンチンを経口投与したときに骨成分が増加するかどうか調べた。 β -クリプトキサンチンを7日間投与(10, 25, 50 μ g/100g体重・日)した後、骨組織中のカルシウム量、アルカリ性ホスファターゼ治性(骨石灰化促進酵素)及びデオキシリボ

10 核酸(DNA; 骨組織中細胞数の指標)量を実施例1記載の方法で測定

した。結果を表 5 及び第 19 図～第 24 図に示す。なお、それぞれの試験群は 6 回ずつ測定し、平均値及び標準誤差で示した。また、有意差検定には Student's t-test を用いて求め、対照と比較して P 値が 0.01 以下 (*) であれば統計学的に有意差ありとした。その結果、骨幹部及び骨幹部組織のカルシウム量は、 β -クリプトキサンチンの投与(10, 25, 50 μ g/100g 体重・日)により、有意に増加した。骨幹部及び骨幹部組織のアルカリホスファターゼ活性(骨石灰化促進酵素)は、 β -クリプトキサンチンの投与(10, 25, 50 μ g/100g 体重・日)により、有意に増加した。骨組織中 DNA 量(骨組織中の細胞数の指標)は、骨幹部においては、 β -クリプトキサンチンの投与(25 及び 50 μ g/100g 体重・日)で有意に増加し、骨幹部では、 β -クリプトキサンチンの投与(10, 25, 50 μ g/100g 体重・日)で有意に増加した。

以上のことより、 β -クリプトキサンチンは、経口投与することにより、骨成分量を増加し、骨量増進効果を有することが確認できた。このことから、 β -クリプトキサンチンは、骨形成促進剤として有用であり、骨粗鬆症の予防と治療に有効であると考えられる。

(表 5)

骨幹部組織				
	対照	β -クリプトキサンチン(μ g/100g体重・日)		
		10	25	50
骨カルシウム量 (mg/g乾燥重量)	205.1 \pm 5.40	232.8 \pm 3.00*	248.3 \pm 5.10*	247.5 \pm 4.20*
骨アルカリ性ホスファターゼ活性 (μ mol/min/mg蛋白質)	1.02 \pm 0.010	2.38 \pm 0.019*	2.35 \pm 0.021*	1.85 \pm 0.025*
骨DNA量 (mg/g骨湿重量)	1.75 \pm 0.11	1.95 \pm 0.18	3.01 \pm 0.23*	2.53 \pm 0.20*

骨幹端部組織				
	対照	β -クリプトキサンチン(μ g/100g体重・日)		
		10	25	50
骨カルシウム量 (mg/g乾燥重量)	168.3 \pm 4.00	201.5 \pm 5.60*	200.3 \pm 3.90*	205.9 \pm 4.10*
骨アルカリ性ホスファターゼ活性 (μ mol/min/mg蛋白質)	1.28 \pm 0.013	2.21 \pm 0.023*	2.54 \pm 0.029*	1.92 \pm 0.015*
骨DNA量 (mg/g骨湿重量)	2.56 \pm 0.15	4.10 \pm 0.24*	4.25 \pm 0.21*	4.01 \pm 0.18*

5

産業上の利用可能性

本発明によると、 β -クリプトキサンチンを有効成分とすることで、積極的に骨形成を促進して骨疾患を予防・治療することができる顕著な効果を有する骨形成促進剤や、骨形成促進作用と骨吸収抑制作用の両作用を有する骨粗鬆症等の骨疾患の予防・治療薬を提供することができる。

10

請 求 の 範 囲

1. β -クリプトキサンチンを有効成分とすることを特徴とする骨形成促進剤。
- 5 2. β -クリプトキサンチン含有組成物を有効成分とすることを特徴とする骨形成促進剤。
3. β -クリプトキサンチン含有組成物が、温州みかんの処理物であることを特徴とする請求項2記載の骨形成促進剤。
4. β -クリプトキサンチンを有効成分とすることを特徴とする骨疾患
- 10 の予防・治療薬。
5. β -クリプトキサンチン含有組成物を有効成分とすることを特徴とする骨疾患の予防・治療薬。
6. β -クリプトキサンチン含有組成物が、温州みかんの処理物であることを特徴とする請求項5記載の骨疾患の予防・治療薬。
- 15 7. 骨疾患が骨粗鬆症であることを特徴とする請求項4～6のいずれか記載の骨疾患の予防・治療薬。
8. β -クリプトキサンチンを添加したことを特徴とする骨疾患の予防・治療用機能性食品又は食品素材。
9. β -クリプトキサンチン含有組成物を添加したことを特徴とする骨
- 20 疾患の予防・治療用機能性食品又は食品素材。
10. β -クリプトキサンチン含有組成物が、温州みかんの処理物であることを特徴とする請求項9記載の骨疾患の予防・治療用機能性食品又は食品素材。
11. 骨疾患が骨粗鬆症であることを特徴とする請求項8～10のいずれ
- 25 つか記載の骨疾患の予防・治療用機能性食品又は食品素材。
12. β -クリプトキサンチンを配合したことを特徴とする飼料用組成

物。

13. β -クリプトキサンチン含有組成物を配合したことを特徴とする飼料用組成物。

5 14. β -クリプトキサンチン含有組成物が、温州みかんの処理物であることを特徴とする請求項13記載の飼料用組成物。

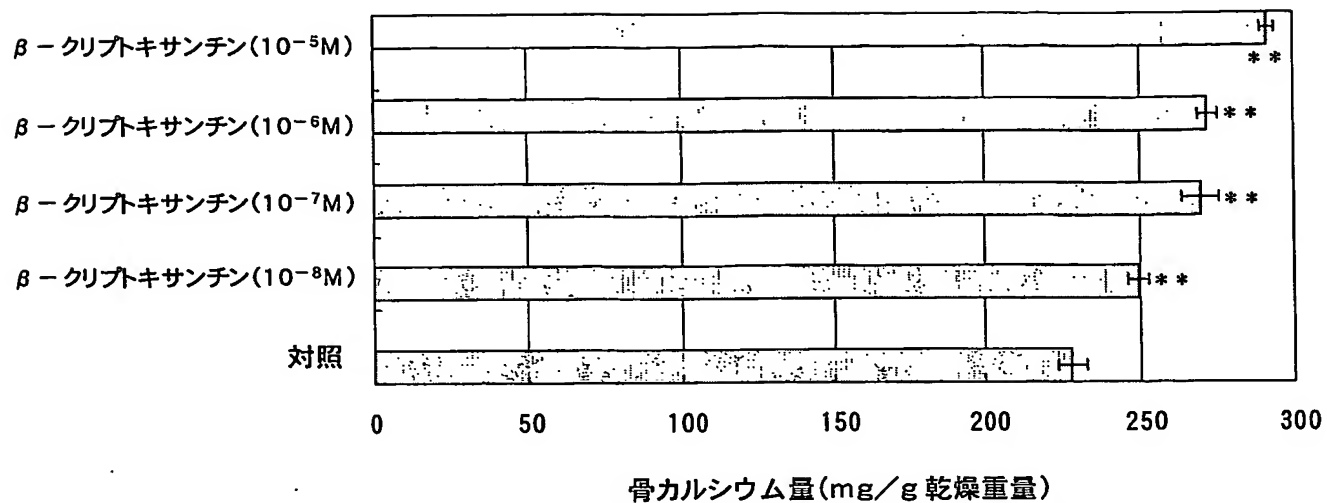
15. β -クリプトキサンチンをリード化合物とすることを特徴とする骨形成促進又は骨疾患に対する予防・治療のための有効成分をスクリーニングする方法。

10 16. 骨疾患が骨粗鬆症であることを特徴とする請求項15記載の骨形成促進又は骨疾患に対する予防・治療のための有効成分をスクリーニングする方法。

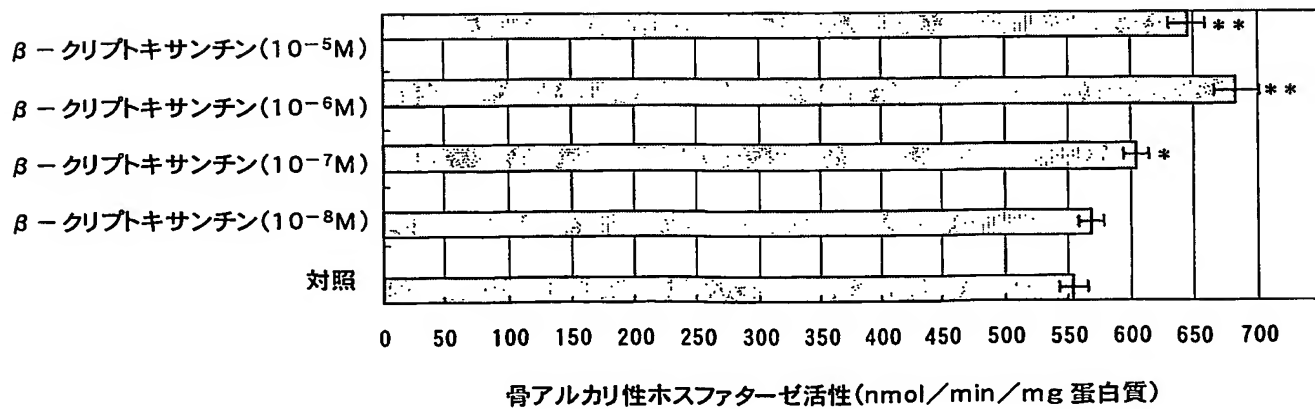
17. 請求項15又は16記載のスクリーニングする方法により得られることを特徴とする β -クリプトキサンチンをリード化合物とした骨形成促進剤又は骨疾患の予防・治療剤。

15 18. 骨疾患が骨粗鬆症であることを特徴とする請求項17記載の β -クリプトキサンチンをリード化合物とした骨形成促進剤又は骨疾患の予防・治療剤。

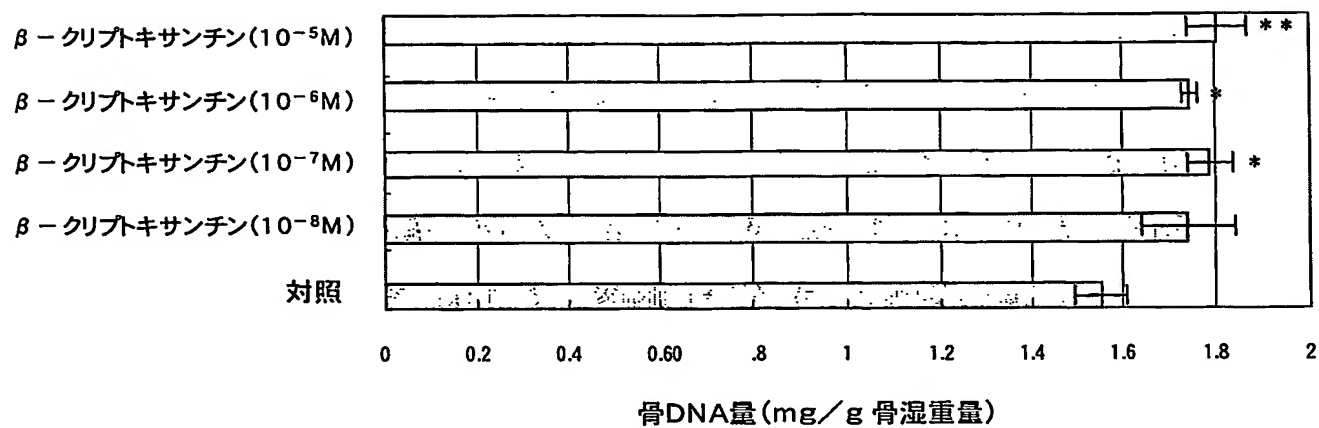
第 1 図



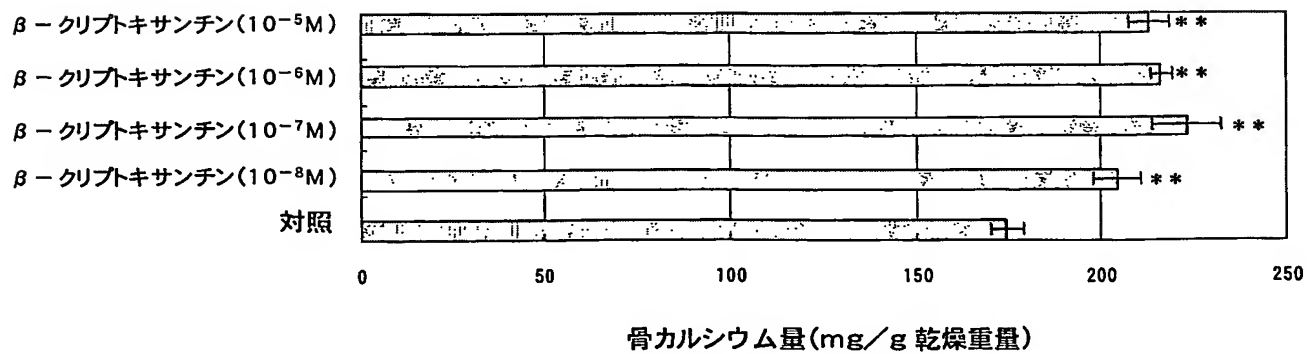
第 2 図



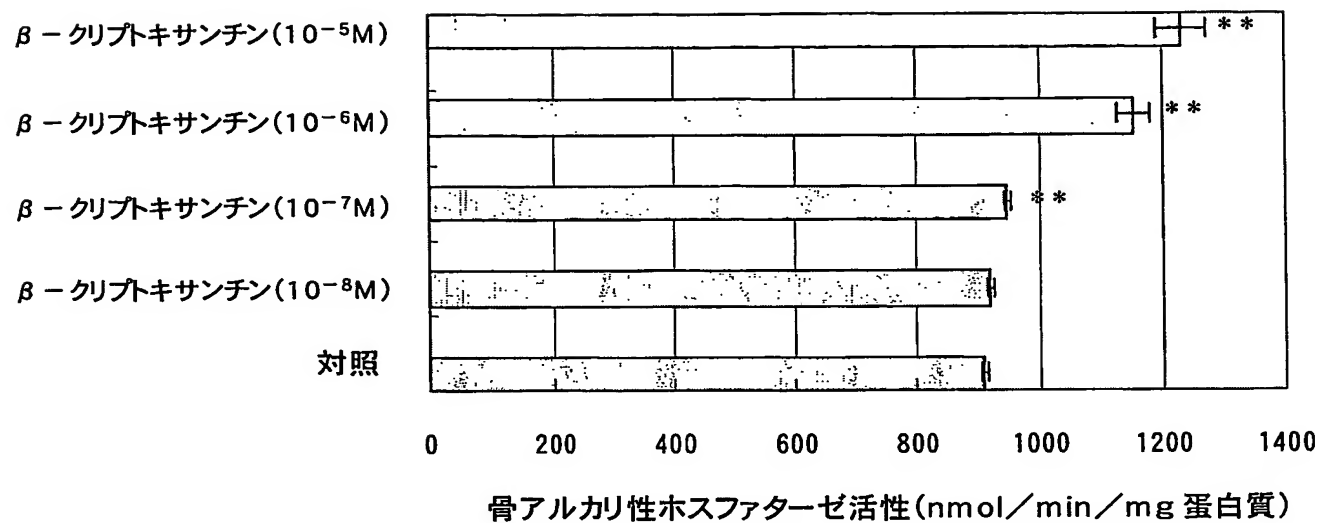
第 3 図



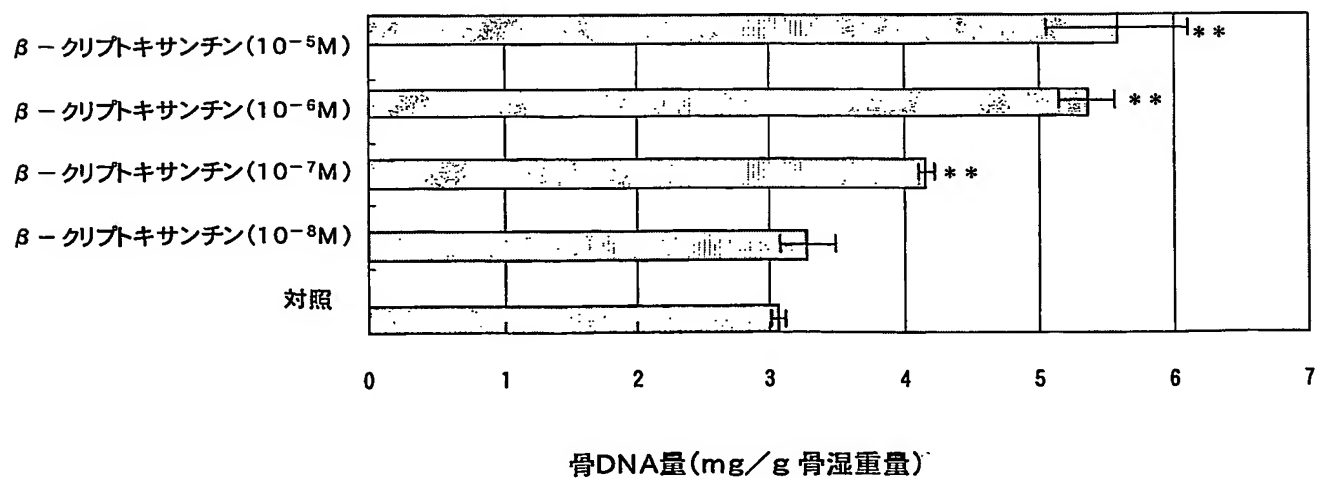
第 4 図



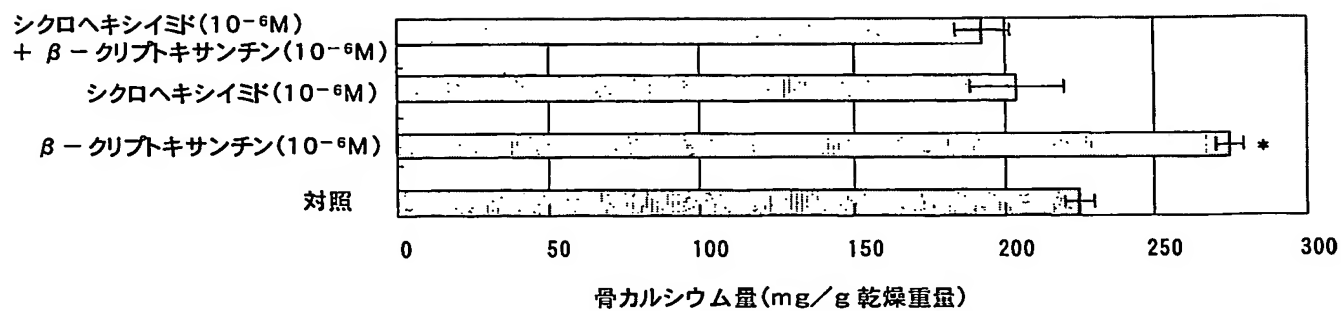
第 5 図



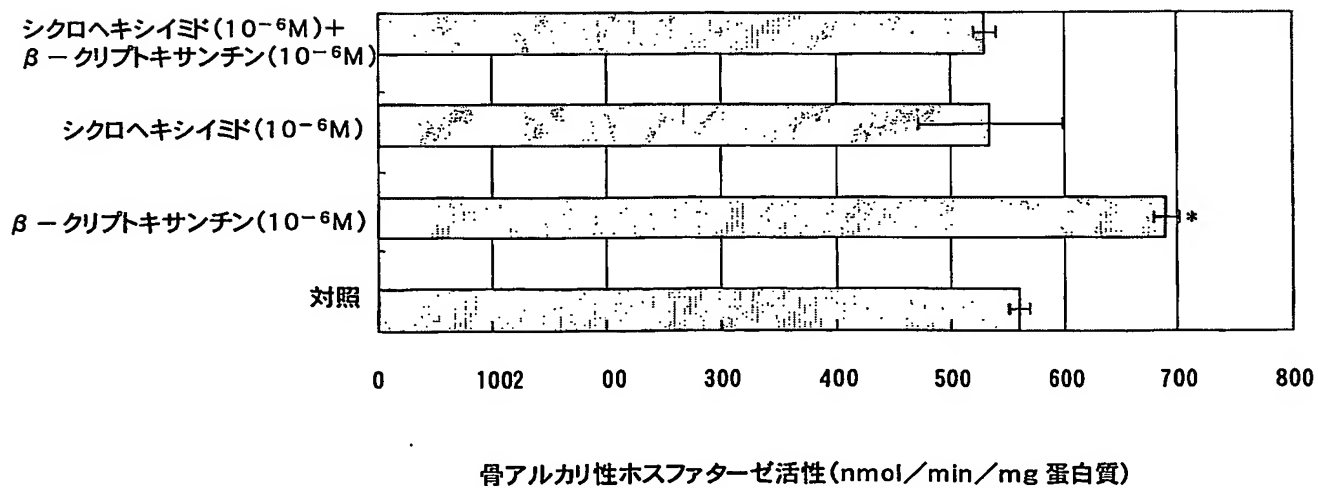
第 6 図



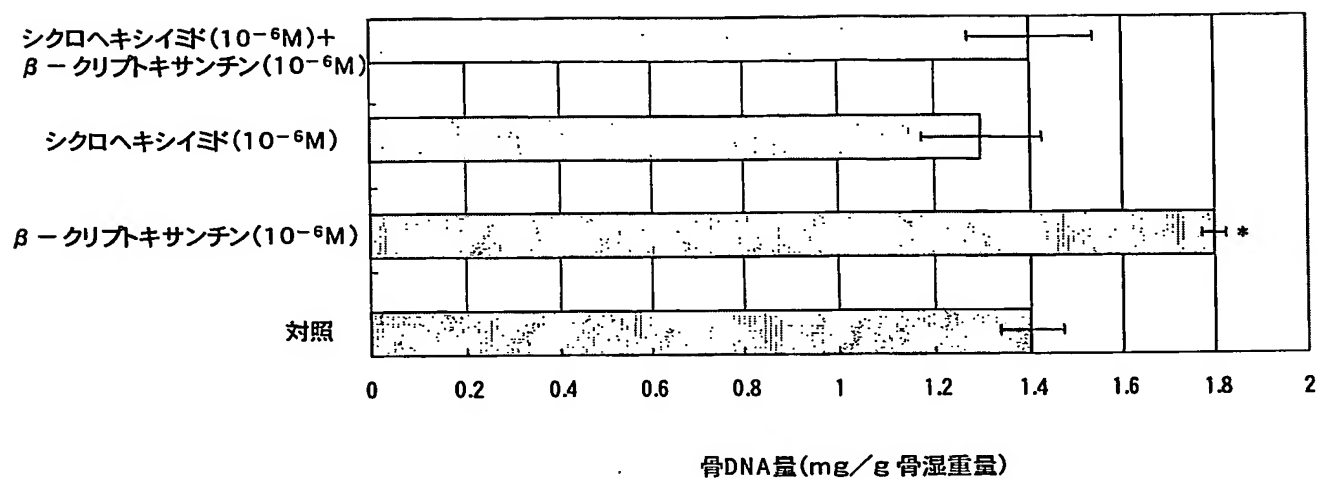
第 7 図



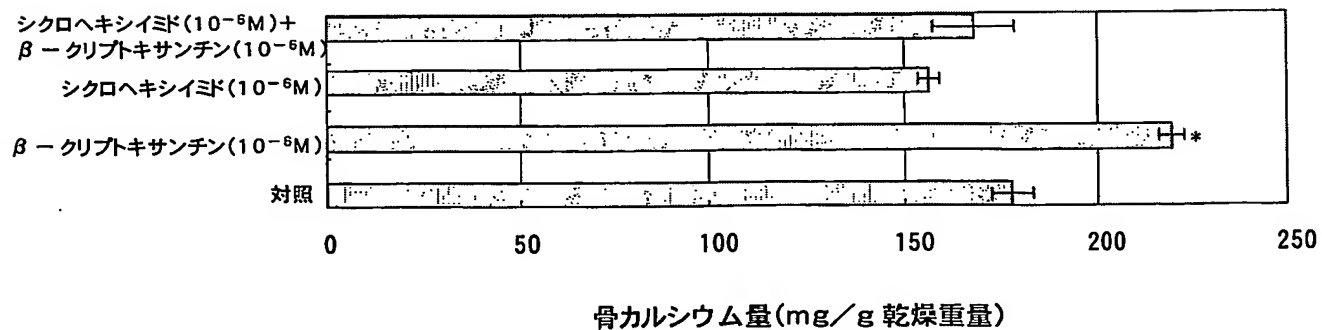
第 8 図



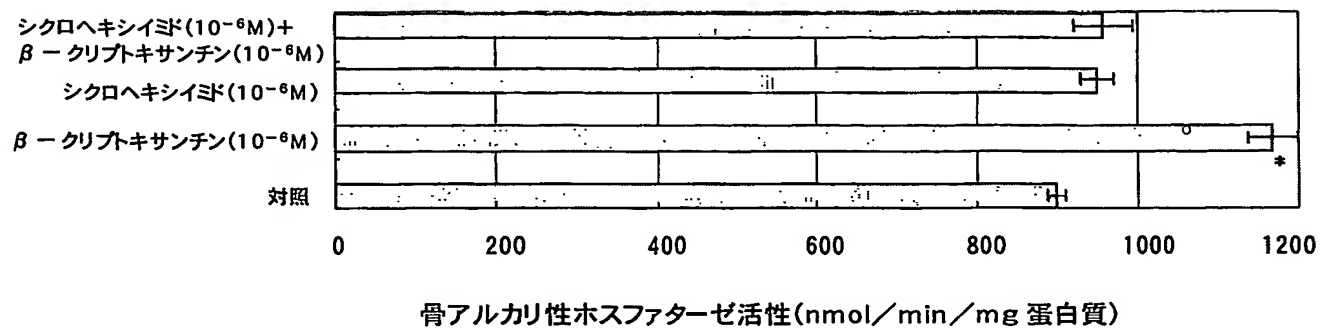
第 9 図



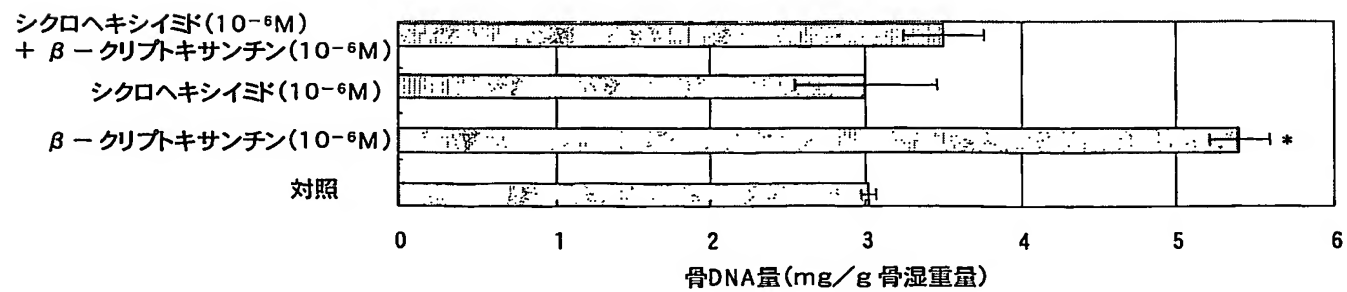
第 10 図



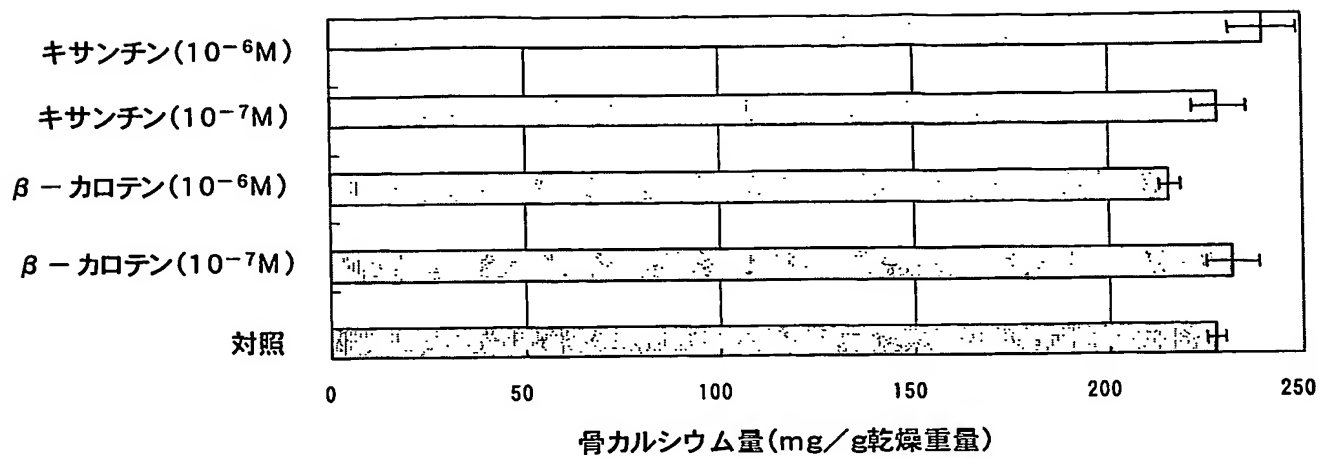
第 1 1 図



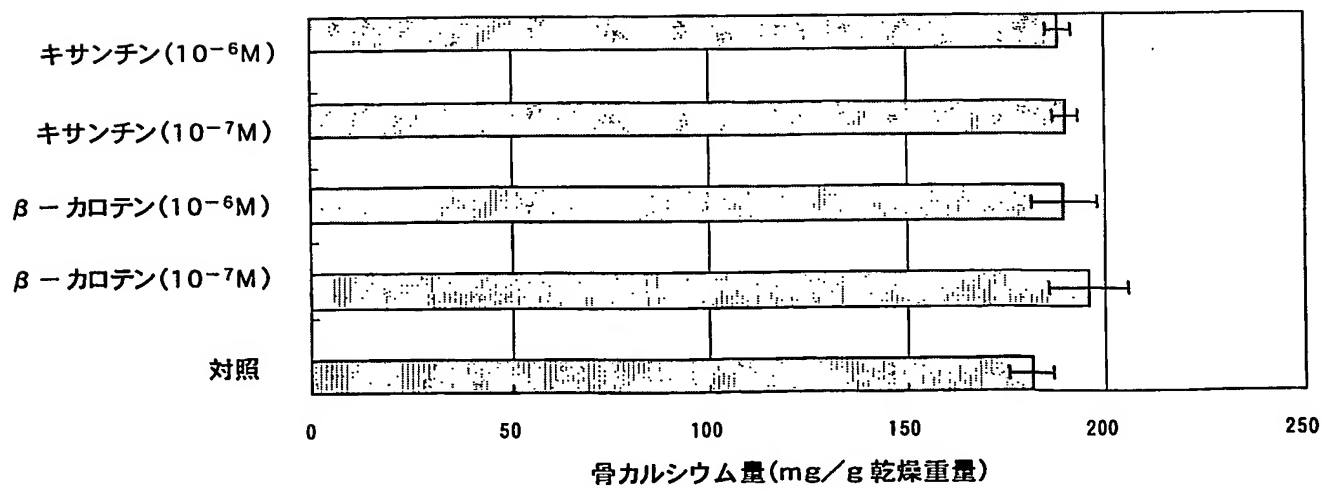
第 1 2 図



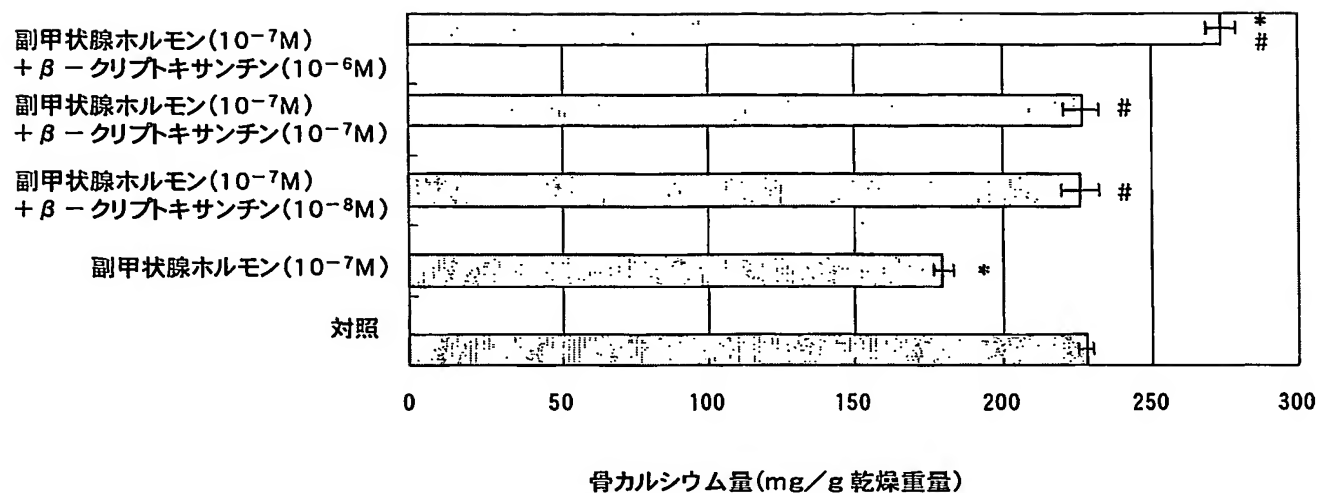
第 13 図



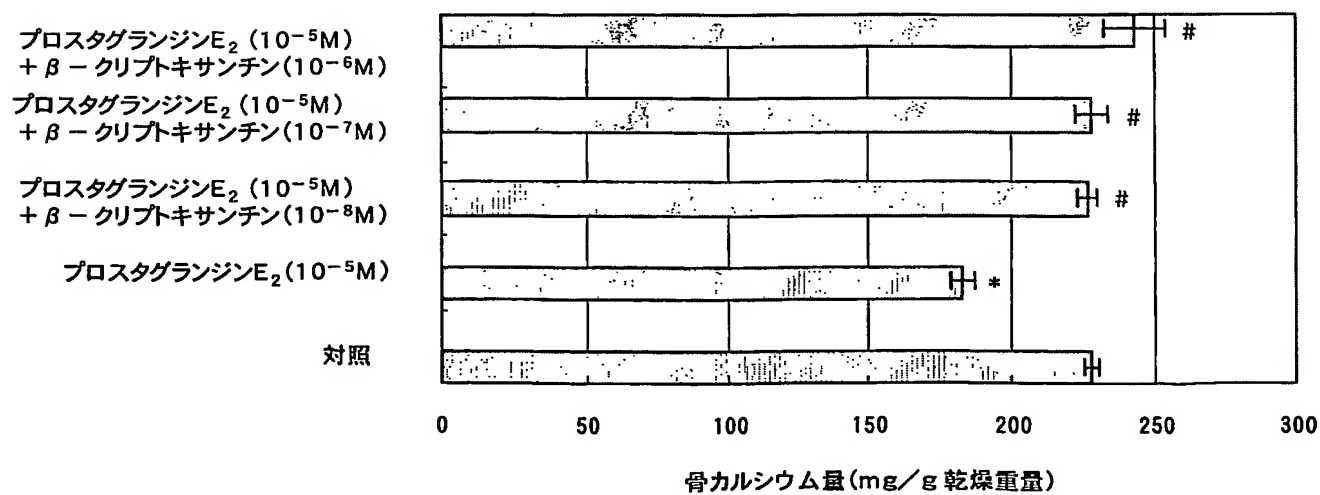
第 14 図



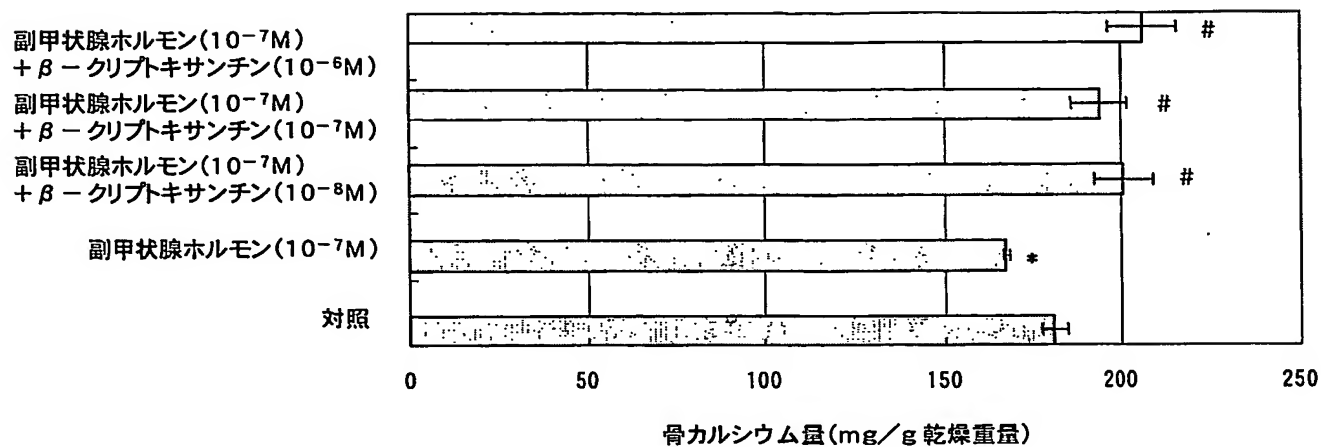
第 15 図



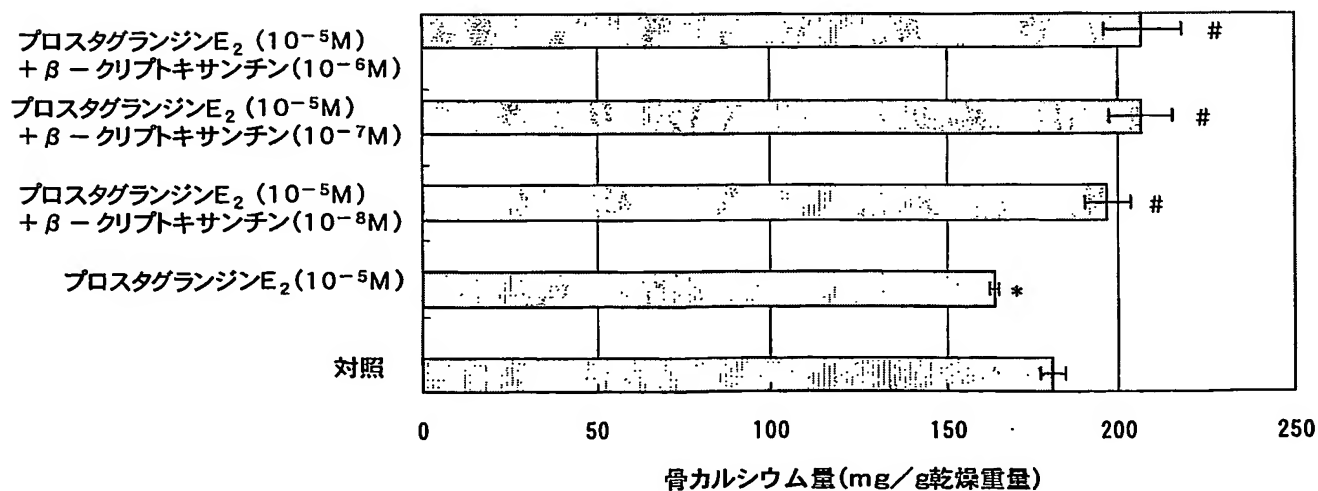
第 16 図



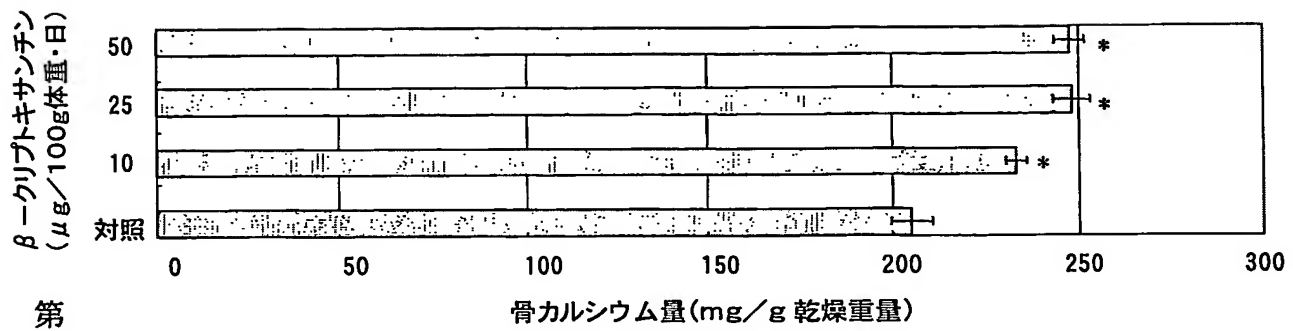
第 17 図



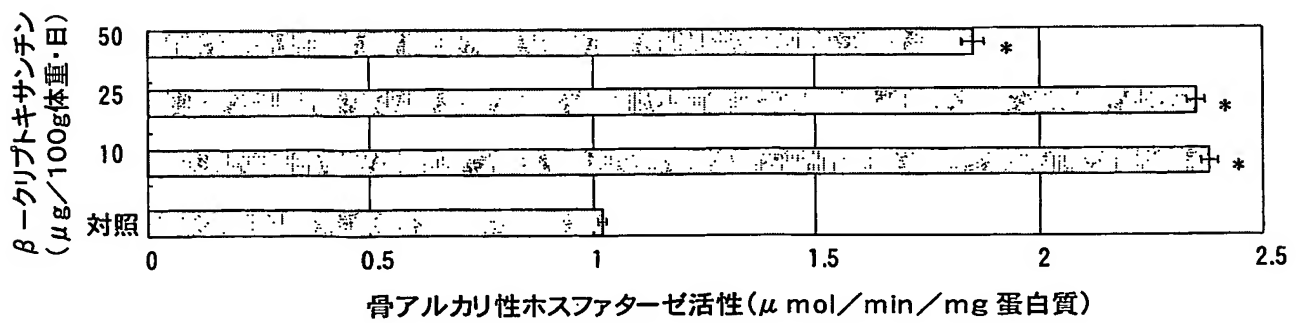
第 18 図



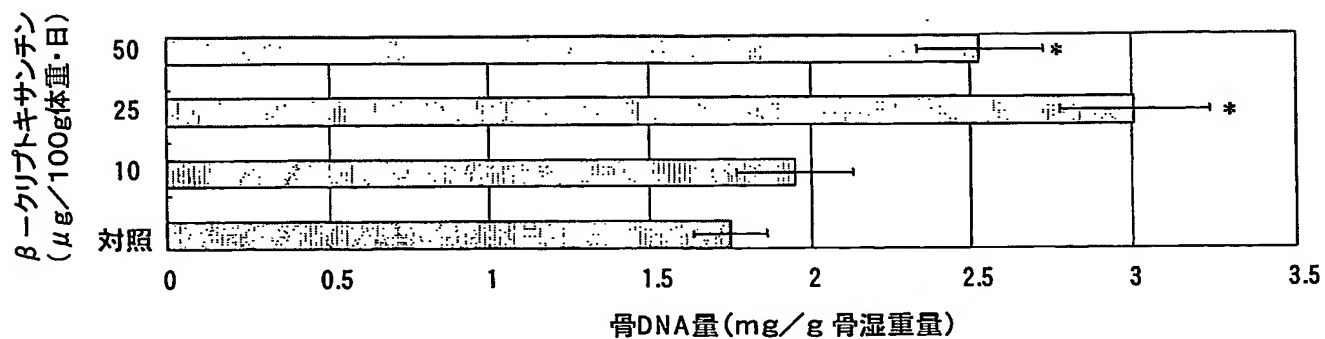
第 19 図



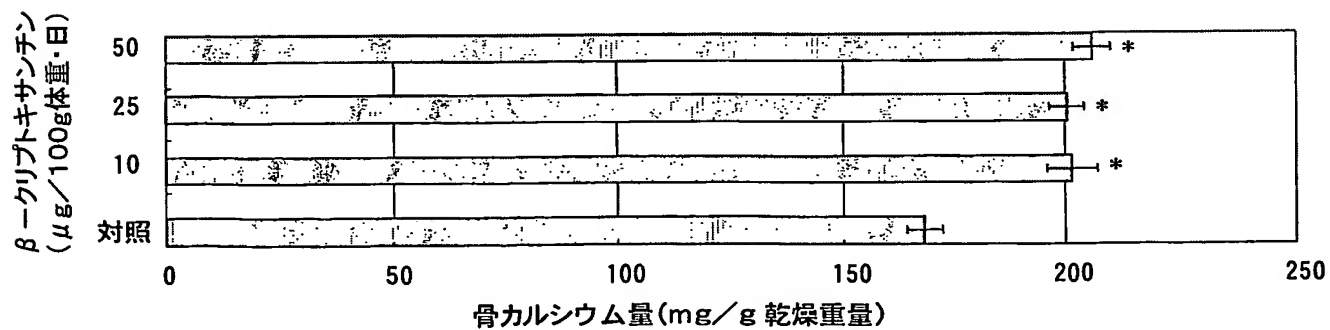
第 20 図



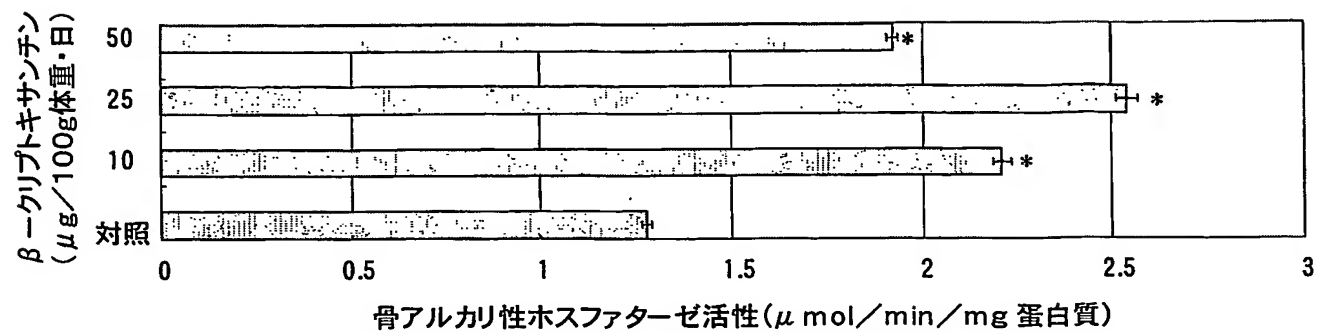
第 2 1 図



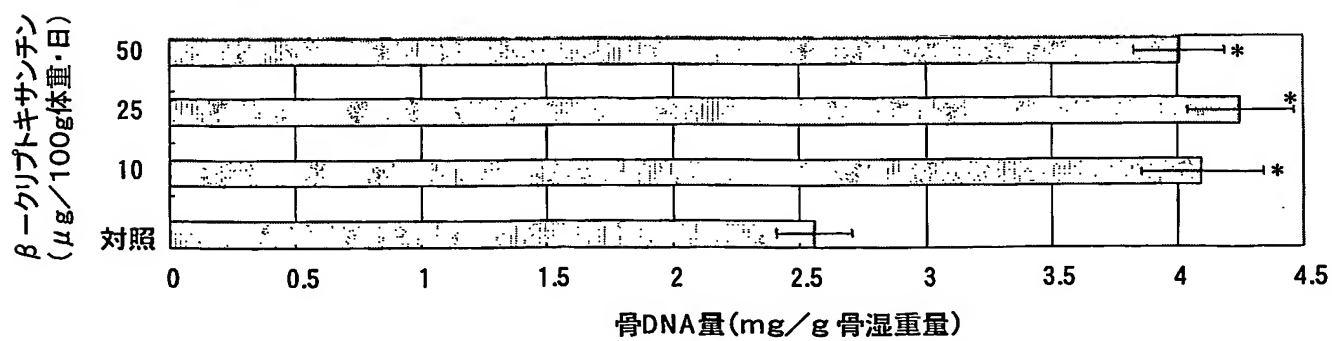
第 2 2 図



第 2 3 図



第 2 4 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13561

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K31/045, 35/78, 45/00, A61P19/08, 19/10, A23L1/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K31/045, 35/78, 45/00, A61P19/08, 19/10, A23L1/30

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), Medline (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN), JOIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	JP 2002-338485 A (Eiko IIZUKA), 27 November, 2002 (27.11.02), Full text (Family: none)	1-14, 17, 18
X	JP 2000-23637 A (Kabushiki Kaisha Ehime Kankitsu Shigen Kaihatsu Kenkyusho), 25 January, 2000 (25.01.00), In particular, Par. No. [0033] (Family: none)	8-14
A	JP 2000-136181 A (Biological Specific Industry Technological Research Propellant Organization), 16 May, 2000 (16.05.00), Full text (Family: none)	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
25 November, 2003 (25.11.03)

Date of mailing of the international search report
09 December, 2003 (09.12.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13561

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 7-215849 A (Eisai Co., Ltd.), 15 August, 1995 (15.08.95), Full text (Family: none)	1-18
A	JP 10-36256 A (Masayoshi YAMAGUCHI), 10 February, 1998 (10.02.98), Full text (Family: none)	1-18
A	US 5935996 A (Taishi Foods Co., Ltd.), 10 August, 1999 (10.08.99), Full text & JP 10-114653 A	1-18
A	JP 10-218767 A (Nissho Corp.), 18 August, 1998 (18.08.98), Full text (Family: none)	1-18
A	JP 10-279492 A (Shizuoka-ken), 20 October, 1998 (20.10.98), Full text (Family: none)	1-18
A	JP 2000-191526 A (Kabushiki Kaisha Marumiya), 11 July, 2000 (11.07.00), Full text (Family: none)	1-18
A	WO 99/23587 A2 (CEREP), 14 May, 1999 (14.05.99), Full text & EP 918296 A1 & JP 2001-521943 A	15, 16

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/045, 35/78, 45/00, A61P19/08, 19/10,
A23L1/30

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/045, 35/78, 45/00, A61P19/08, 19/10,
A23L1/30

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), Medline (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN), JOIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	J P 2002-338485 A (飯塚 英子) 2002.11.27、全文 (ファミリーなし)	1-14, 17, 18
X	J P 2000-23637 A (株式会社愛媛柑橘資源開発研究 所) 2000.01.25、特に[0033]段落 (ファミリーなし)	8-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25.11.03

国際調査報告の発送日

09.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

伊藤 幸司

4C

9450

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2000-136181 A (生物系特定産業技術研究推進機構) 2000.05.16、全文 (ファミリーなし)	1-18
A	JP 7-215849 A (エーザイ株式会社) 1995.08.15、全文 (ファミリーなし)	1-18
A	JP 10-36256 A (山口 正義) 1998.02.10、全文 (ファミリーなし)	1-18
A	US 5935996 A (Taishi Foods Company Ltd.) 1999.08.10、全文 & JP 10-114653 A	1-18
A	JP 10-218767 A (株式会社ニッショー) 1998.08.18、全文 (ファミリーなし)	1-18
A	JP 10-279492 A (静岡県) 1998.10.20、全文 (ファミリーなし)	1-18
A	JP 2000-191526 A (株式会社丸美屋) 2000.07.11、全文 (ファミリーなし)	1-18
A	WO 99/23587 A2 (CEREP) 1999.05.14、全文 & EP 918296 A1 & JP 2001-521943 A	15, 16

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.